

Estudos sobre a Variola

pelos

Drs. S. von Prowazek e H. de Beaurepaire Aragão

(Com 2 figuras no texto e estampas N. 7 e 8)

Variola-Untersuchungen

von

Dr. S. von Prowazek und Dr. H. de Beaurepaire Aragão

(Mit 2 Textfiguren und Tafel 7 u. 8)

A epidemia da variola no Rio, em 1908, nos proporcionou a oportunidade de fazer estudos sobre o virus produtor dessa molestia. Os resultados das pesquisas então feitos foram rezumidamente publicados no «Münchener Medizinische Wochenschrift», n.º 44, 1908. A fôrma aforística do comunicado deu lugar a equívocos, pelo que nos decidimos a voltar ao assunto de maneira mais minucioza.

I. O produtor da variola

Para que podessemos abordar mais de perto a questão do agente produtor da variola fizemos em primeiro lugar estudos de orientação sobre a *filtrabilidade* do virus, e assim pudemos nos convencer que o virus de pustulas recentes, desde que não esteja de mistura com grande cópia de detritos celulares, que, além de obstruir os póros, absorvem o virus atravessam os filtros de papel espesso, asbesto, BERKEFELD e UHLENHUTH. Com os filtrados assim obtidos conseguimos sempre inoculações positivas na cornea de coelhos. A cornea inoculada era cuidadosamente retirada, ao cabo de 48 horas, fixada com o sublimado-alcool, incluída em parafina, e os córtexes córados, no mais das vezes com a he-

Während der Variola-Epidemie in Rio 1908 bot sich uns die Gelegenheit dar, uns mit dem Virus der Variola eingehend zu beschäftigen; die damals gemeinsam gewonnenen Resultate der Untersuchung wurden vor kurzem in der Münchener medizinischen Wochenschrift (Nr. 44, 1908) publiziert. Die aphoristische Form der Mitteilung hat jedoch zu Missverständnissen Anlass gegeben und so haben wir uns entschlossen, nochmals in ausführlicher Weise über das genannte Thema Bericht zu erstatten.

I. Der Erreger der Variola

Um der Frage nach dem Erreger der Variola näher zu kommen, wurden in erster Reihe zur Orientierung verschiedene *Filtrationsversuche* mit dem Virus angestellt und wir konnten uns zunächst davon überzeugen, dass frisches Pustelvirus, das nicht mit übermässig viel Zelldetritus vermischt ist, wodurch begreiflicherweise die Poren des Filters bald verstopft werden und auch das Virus absorbiert wird, in den meisten Fällen dicke Papierfilter, Asbest-, BERKEFELD- und UHLENHUTH-Filter passiert. Wir konnten mit diesen derart gewonnenen Filtraten jederzeit positive Im-

matxilina ferrea de HEIDENHAIN. Na maioria dos casos puderam ser caracterizados os *corpúsculos de Guarnieri*, típicos da variola.

Esforçámo-nos por libertar, tanto quanto possível o vírus do sôro e da albumina, lavando-o radicalmente por muito tempo, o que simultaneamente, o enriquecia. Para isso conseguir, a exemplo do que já havia sido feito com o vírus da *Hühnerpest*, filtrámos o material fresco através de camadas coloidais (agar a 3%). Foi observada a seguinte técnica: Um filtro de papel bem molhado com agua fisiologica era colocado no interior dum pequeno funil a cujas paredes era fixado por um cone de platina e tornado aderente a ellas por meio da aspiração exercida pela trompa d'agua. Por 3 ou 4 vezes; sobre o filtro era lançado o agar de maneira a todo o papel ficar por elle impregnado e que um pequeno depozito do material se accumulasse no fundo. Condição capital para o successo da filtração é que o agar impregne igualmente toda superficie do filtro de papel, sem que se formem lacunas. Impregna-se o filtro, lançando sobre elle certa porção de agar liquefeito, girando o aparelho em posição horizontal, de maneira que o coloide se solidifique, formando tenue camada.

Apóz solidificação do agar, lança-se sobre o filtro o filtrado, já a algum tempo obtido pela passagem através do papel de material de pustulas, um pouco diluido em agua fisiologica e deixa-se filtrar por aspiração lenta durante 1 á 3 horas. (Fig. 1).

A filtração deve ser acompanhada cuidadosamente e sob continua vijilancia, porquanto apóz a passagem das ultimas porções de liquido a camada coloidal facilmente se fende e, nesse cazo, o filtrado é inutilizavel. O tenue depozito obtido sobre a massa de agar é estendido para preparados em laminas com uma alça de platina; são estes desecados, privados do resto de sôro por lavajens successivas com agua destilada, de novo desecados e fixados durante algumas horas em alcool absoluto e córados com a fucsina anilizada de LOEFFLER.

Para se obter maiores porções de filtrados procedeu-se, segundo os conselhos de GIEMSA, do seguinte modo:

pfungen an der Kaninchenkornea vornehmen. Die geimpfte Kornea wurde nach 48 Stunden sorgfältig herausgenommen, in Sublimatalkohol fixiert, in Paraffin eingebettet und die Schnitte in den meisten Fällen mit HEIDENHAINS Eisenhämatoxylin gefärbt. In der Mehrzahl der Fälle wurden in den Schnitten die auch für die Variola typischen GUARNIERI'schen *Körperchen* nachgewiesen.

Unser Bestreben ging aber dahin, das Virus möglichst von dem Serum und dem Eiweiss zu befreien, es längere Zeit gründlich zu waschen und gleichzeitig in grösseren Mengen anzureichern. Zu diesem Zwecke filtrierten wir das frische Material nach Analogie der Filtrationsversuche bei der Hühnerpest durch Kolloidschichten (Agar-Agar 3%). Es wurde folgende Versuchsanordnung getroffen: Ein mit physiologischer Kochsalzlösung benetzter Filterpapiertrichter wurde mit Hilfe eines Platinkonus in einen kleinen Glastrichter dicht durch Ansaugen mit einer Wasserstrahlpumpe sorgfältig eingefügt und dann 3—4 mal mit Agar-Agar derart durchtränkt, dass die Substanz überall den Papierrand überdeckte und an der Basis einen kleinen Agarschichtkegel bildete. Ein Haupterfordernis für gute Filtrationsresultate ist, dass die Agarsubstanz gleichmässig den Papiertrichter durchtränkt und lückenlos bedeckt; bei der Durchtränkung verfährt man derart, dass man den flüssigen Agar jedesmal aus dem Trichter, den man in horizontaler Lage rotiert, hinausgiesst und den geringen Rest des Kolloids in Form einer dünnen Schicht erstarren lässt.

Nach dem Erstarren des Agars wurde nach einiger Zeit das vorher durch Papier filtrierte, etwas mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnte Pustelmaterial unter mässigem Druck langsam in 1-3 Stunden hindurchfiltriert. (Textfigur 1).

Die Filtration muss vorsichtig unter steter Kontrolle erfolgen, weil nach dem Passieren der letzten Flüssigkeitsmenge die Kolloidgallertschicht des Agarkegels sich leicht spaltet und das Filtrat unbrauchbar wird. Der leichte Belag des Agarkegels wurde dann mit der Platinöse zu Ausstrichen verarbeitet, diese wurden hierauf getrocknet, der Serumrest

Impregnou-se repetidas vezes de agar uma vela PUKAL cortada, de maneira que, apoz solidificação do coloide, se formasse no interior della tenue e regular camada, atravez a qual se fez a filtração. Por intermedio de rolha de borracha perfurada era a vela unida a um tubo de vidro capilar de paredes espessas e que entrava no interior de um frasco de filtração. O denominado ultra filtrado é recebido em tubo de ensaio esteril. (Fig. 2).

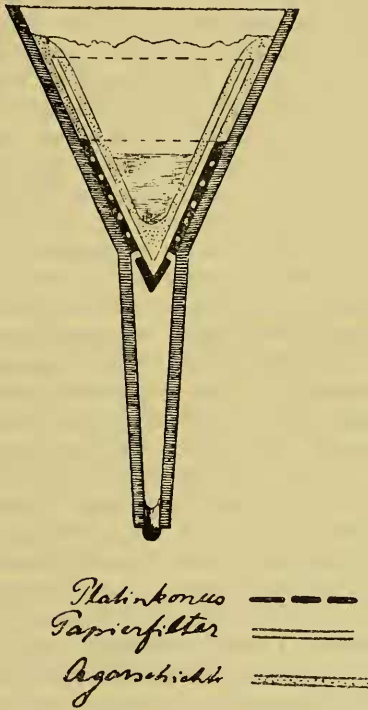


Fig. 1

Para que se obtivesse material livre de bacterios, era em alguns cazos, o conteúdo das pustulas diluido e passado atravez a vela de BERKEFELD e, assim, maior porção desse filtrado era reduzida com o filtro de coloide acima referido. Por equal processo podia-se conseguir vacina livre de bacterios. Para este fim é mister previamente triturar com cuidado o material de vacina, diluil-o, passal-o atravez um filtro de BERKEFELD e concentral-o finalmente em filtros de coloide. Em todos os cazos que pesquisámos pudémos

durch Einlegen oder Uebergiessen von Aqua destillata entfernt, abermals getrocknet, dann mehrere Stunden in Alkohol absolut fixiert und nach LÖFFLER mit Anilinfuchsin gefärbt.

Um grössere Mengen des Filtrates zu erhalten, verfuhr man nach dem Vorschlage von GIEMSA in folgender Weise: Eine abgeschnittene PUKAL-Filterkerze wurde mit Agar-Agar mehrere Male in der Weise ausgegossen, dass nach dem Erstarren des Kolloids innen eine dünne, gleichmässige Agarschicht entstand, durch welche das Virus hernach durchfiltriert wurde. Durch einen geeignet durchbohrten Gummipropfen wurde die derart ausgegossene Kerze mit einem dickwandigen Kapillarrohr verbunden, das in das Innere einer Filtrationsflasche hineinragt. Das sogenannte

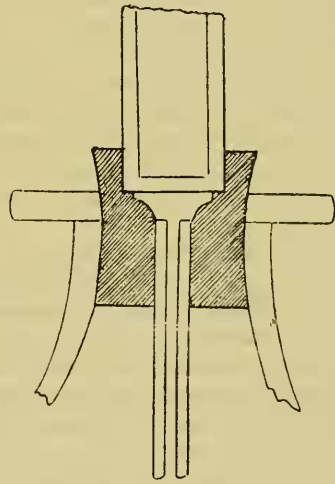


Fig. 2

Ultrafiltrat wurde in einem sterilen Reagensrohr aufgefangen. (Textfig. 2). Um bakterienfreies Material zu erhalten, wurde in einigen Fällen der verdünnte Inhalt der Pocken zuerst durch BERKEFELD-Filter filtriert und dann grössere Mengen dieses Filtrats in den oben geschilderten Kolloidfiltertrichtern eingengt und untersucht. Auf diese Weise könnte man auch eine bakterienfreie Vaccine gewinnen. Zu diesem Zwecke ist es notwendig, das Vaccinematerial vorher sorgfältig zu zerreiben und dann verdünnt durch BERKEFELD-Filter zu fil-

verificar nos preparados córados pelo LOEFFLER corpusculos redondos, extremamente pequenos, nitidamente diferenciados, córados de vermelho escuro e que, ás vezes, se dividiam sob a fôrma de *diplococos*. Eram *menores* que as menores fôrmas bacterianas até hoje conhecidas. Os corpusculos da variola multiplicam-se por uma especie de bipartição depois de certo aumento de tamanho. Não tomam o GRAM; córam-se pela fucsina de ZIEHL, pela eozina-azur de GIEMSA e pela tionina. Contrariamente ao que se verifica com os estreptococos e com os nucleos dos leucócitos não se córam, mesmo apoz longo contato com o *Neutralrot* ou *Brillantkresylblau*. No estado vivo mostram-se sob fôrma de pontos pequeníssimos que refratam moderadamente a luz (brilhantes). Como foram estes corpos encontrados recentemente por nós, em material de variola, assim como foram elles obtidos no filtrado das velas de BERKEFELD, concentrado num filtro de coloide, com exclusão de outra qualquer fôrma microbiana, e, como, com este produto obtinhamos com successo a inoculação da cornea de coelho, julgamo-nos autorizados a consideral-os como *microbios da variola*.

Quando efetuámos essas pesquisas já existiam sob o mesino assunto, 3 trabalhos que se podiam relacionar com as nossas observações, de CASAGRANDI, VOLPINO e de PASCHEN. Sobre a questão de serem todas as figuras vistas identicas, diremos apenas algumas palavras, porquanto VOLPINO «(Zentralblatt f. Bakt.», Bd. 49, H. 2) já enfeixou em um artigo de sintheze os caracteres de todos os corpusculos até hoje observados na variola. Julgamos que, sobretudo, se deve pôr em cotejo os corpusculos descritos por VOLPINO e PASCHEN. Nossos corpusculos assemelham-se mais, no que respeita fôrma e aspeto aos descritos por VOLPINO. As características dadas por VOLPINO concordam essencialmente com as do nosso descobrimento, a não ser que não encontrámos nos nossos corpusculos grandes movimentos comparaveis aos que se observam nos infuzorios e flajelados. Não negamos, comtudo, a existencia de certo movimento nos corpusculos em ques-

trieren und zum Schluss etwa in Kolloidsäcken einzuengen.

In allen von uns untersuchten Fällen konnten in den nach LÖFFLER gefärbten Präparaten kleinste, vollkommen scharf differenzierte, dunkelrot gefärbte, rundliche Körperchen, die sich zuweilen in *Diplokokkenform* teilten, nachgewiesen werden. Sie waren *kleiner* als die kleinsten bisher bekannten Bakterien. Die Variolakörperchen vermehren sich durch eine Art von Zweiteilung und nehmen vorher etwas *an Grösse zu*. Sie färben sich nicht nach GRAM, nehmen jedoch die Färbung mit Fuchsin nach ZIEHL, GIEMSA'S Eosin-Azur und Thionin an. Im Gegensatz zu den Streptokokken und den Kernen der Leucocyten färben sie sich selbst nach längerer Einwirkungszeit nicht mit Neutralrot oder Brillantkresylblau. Während des Lebens stellen sie winzige, mässig lichtbrechende (schimmernde) Punkte dar. Da wir sie nur in dem Pockenmaterial *konstant* gefunden haben, sowie da sie auch in den auf Kolloidschichten eingeengten Berkefeldfiltraten allein ohne irgend welche weitere Mikroorganismen vorkamen und wir mit diesen Filtraten die Kaninchenkornea mit Erfolg impfen konnten, sprechen wir sie als *Erreger der Variola* an.

Zu der Zeit als unsere Untersuchungen angestellt wurden, lagen über ähnliche Befunde, die allein mit unseren Beobachtungen in Beziehung gebracht werden können, drei Arbeiten und zwar von CASAGRANDI, VOLPINO und PASCHEN vor. Ueber die Frage, ob alle diese Gebilde miteinander identisch sind, können wir uns derzeit kurz fassen, da VOLPINO (Zentralblatt f. Bakt., 49. Bd., H. 2) alle die Merkmale der verschiedenen bis jetzt gefundenen Körperchen in einer zusammenfassenden Uebersicht dargestellt hatte. In Betracht scheinen uns besonders die Körperchen, die VOLPINO und PASCHEN beschrieben haben, zu kommen. Unsere Körperchen sind zunächst bezüglich des Aussehens und der Grösse den Körperchen von VOLPINO am ähnlichsten; die Merkmale, die VOLPINO angibt, stimmen wesentlich mit den von uns gefundenen überein, nur dass wir nicht eine grosse Beweglichkeit der Körperchen, etwa nach Art der Flagellaten und Infusorien annehmen kön-

tão, movimento analogo ao das granulações de pigmento dos parasitos da malaria por ocasião da formação dos flagelos. Os corpusculos que PASCHEN foi o primeiro a descrever na vacina e dos quais tivemos para comparação um preparado (de corpusculos da variola) são relativamente aos nossos, um pouco maiores ($1/2 \mu$), diferença esta que PASCHEN atribue aos metodos de coloração. No começo, acreditavamos numa diferença de tamanho de virus varioloso, em relação ao vacinico; agóra, porém, já não pensamos desse modo. Qual foi o primeiro a observar os verdadeiros corpusculos, é questão hoje difficil de dididir, por isso que para diferenciação delles quazi não existem carateristicas *morfologicas* e as dimensões variam conforme a coloração, (PASCHEN) o modo de se fazer a preparação ou estado de conservação do material. Os corpusculos descritos, em primeiro lugar, por PROWAZEK, como corpusculos iniciais consideramol-os como estádios de desenvolvimento do virus; PASCHEN foi o primeiro a *descrever*, de modo *indubitavel*, corpusculos menores que esses.

Os corpusculos acima descritos representam como já dissemos, apenas o estádio *vegetativo* do virus variolico. Inoculando-se esse virus na cornea de coelhos, ás vezes, foram tornadas viziveis no protoplasma das celulas epiteliais figuras maiores, em via de multiplicação e que são identicas aos corpusculos iniciais anteriormente descritos. Estes ultimos estádios de desenvolvimento acham-se incluídos, nos primeiros periodos da infeção nos *corpusculos* de GUARNIERI. e, nos córtes bem sucedidos, córados pela hematoxilina ferrea, azul VICTORIA, violeta de genciana, eozina-azur de GIEMSA, patenteam-se sob a fórmula de corpusculos fortemente córados, arredondados ou alongados no interior duma especie de vacuolo dos *corpusculos* de GUARNIERI. Nelles, como já anteriormente foi referido, nota-se um certo movimento oscilatorio.

A subsequente transmutação dessa figura em *corpusculos* de GUARNIERI não foi verificada com segurança.

Os preparados de pustula variolica fixados humidos pelo sublimado alcool e córados

nen. Wir leugnen jedoch nicht eine Beweglichkeit der fraglichen Körperchen, die etwa der Bewegung der Pigmentkörner bei der Geisselung eines Malariaparasiten gleichkommt. Die Körperchen, die PASCHEN zuerst bei Vaccine beschrieben hatte und von denen uns ein Präparat von Variolakörperchen zum Vergleiche zur Verfügung stand, schienen uns im Verhältnis zu unseren Variolakörperchen etwas grösser zu sein ($1/2 \mu$) doch meint PASCHEN, dass die Grössenunterschiede nur aus der Methode der Färbung zu erklären sind. Wir dachten anfangs an eine Grössenvariation des Variolavirus im Verhältnis zur Vaccine, doch haben wir diesen Standpunkt jetzt aufgegeben. Wer zuerst die eigentlichen Körperchen gesehen hatte, lässt sich jetzt schwer entscheiden, da für die Beurteilung der Erreger uns zunächst so gut wie keine *morphologischen* Merkmale zur Verfügung stehen und die Grössendimensionen je nach Färbung (PASCHEN), Präparation und Erhaltungszustand *schwanken*. Die zuerst von PROWAZEK beobachteten Initialkörperchen sehen wir als Entwicklungsstadien des Virus an; kleinere Körper als diese hat *zuerst* PASCHEN in *unzweideutiger* Weise beschrieben.

Die oben geschilderten Körperchen stellen, wie schon bemerkt, nur das *vegetative* Stadium des Variolavirus dar. Durch Verimpfen des Virus auf die Kaninchenkornea wurden in einigen Fällen im Protoplasma der Epithelzellen grössere, in Vermehrung begriffene Gebilde sichtbar gemacht, die mit den früher beschriebenen Initialkörperchen identisch sind. Die letzteren Entwicklungsstadien werden von den GUARNIERI'schen Körperchen auf der ersten Stufe der Infektion eingeschlossen und sind in günstigen Schnitten, die mit Eisenhämatoxylin, Viktoriablau, Gentianviolett oder GIEMSA's Eosin-Azur gefärbt wurden, als dunkel gefärbte, runde oder längliche Körperchen in einer Art von Vakuole des GUARNIERI'schen Körperchens beobachtet worden. Von ihnen wurde früher angegeben, dass sie unter Umständen eine oscillierende Bewegung ausführen.

Die weiteren Transmutationen dieser Gebilde im GUARNIERI'schen Körperchen sind noch nicht mit Sicherheit erforscht worden.

depois pela hematoxilina mostram, ao lado de muitos leucócitos poli-nucleares, ás vezes, corpos ovulares ou redondos intensamente córados e que não são mais que restos degenerados de nucleos de leucócitos poli-nucleares. Entre esses corpos e os nucleos dos leucócitos que morrem, encontram-se todos os estádios intermediarios.

Para a interpretação dos *corpusculos* de GUARNIERI como produto de reação da célula e, mórmente, do componente plastínico do nucleo é de interesse assinalar o fato de que, nem em todos os cazos elles se assentam junto dos nucleos, como figuras independentes, mas, muitas vezes só se verifica o aumento de volume dos nucleolos. Em um cazo em que se inoculou virus variolico com sôro de variolozo de 21 dias, não se formaram *corpusculos* de GUARNIERI intraplasmáticos, mas, em compensação, os nucleolos do nucleo estavam de tal fróma aumentados que se impunham como *corpusculos* de GUARNIERI. Apoz inoculação de vacina na palpebra interna do *Gecko* póde-se verificar um aumento dos nucleolos. Respeito á biolojia do produtor da vacina consignemos aqui os seguintes fatos: o virus morre apoz um contato de 20 horas com a saponina, bile, tauro colato e oleato de sodio; pela ação da lecithina, marca *Agfa*, seguida de $\frac{3}{4}$ de hóra de centrifugação e sedimentação de 4 horas, obtem-se sobre a cornea de coelho apenas uma reação limitada inteiramente local. Nos leucócitos córados pelo metodo de LOEFFLER observam-se incluzões em fóрма de granulos no interior de vacuolos, redondos ou ovais, nitidamente limitados e que se assemelham aos *corpusculos* descritos.

O denominado ultra-filtrado obtido pela passagem através de camadas coloidais não continha mais virus ativo; coelhos inoculados por via subcutanea com esse produto, por 3 vezes no intervalo de 4 dias, com 2 cc. de cada vez não apresentaram sintoma morbido algum, e não se mostraram imunes quando inoculados com o material virulento, como acontece, na *Hühnerpest*, com as galinhas inoculadas com o ultrafiltrado.

Wird Variolapustelmateriale zu Ausstrichen verarbeitet, die nach der nassen Methode mit Sublimatalkohol fixiert und hernach mit Hämatoxylin gefärbt werden, so findet man neben vielen polynucleären Leucocyten ab und zu ovale oder runde intensiv gefärbte Körper, die nichts anderes sind als degenerierte Kernreste der polynucleären Leucocyten. Zwischen diesen Körpern und den Kernen der zu Grunde gehenden Leucocyten finden sich alle Uebergänge.

Für die Beurteilung der GUARNIERI'schen Körper als Reaktionsprodukte der Zelle und zwar hauptsächlich der Plastinkomponente des Kernes ist die Tatsache von Interesse, dass diese nicht in allen Fällen neben dem Kern als selbständige Gebilde auftreten, sondern vielfach nur die Nucleolen vergrößert sind. In einem Falle, da Variolavirus mit 21 Tage altem Variolaserum verimpft wurde, blieb die Bildung der intraplasmatischen GUARNIERI'schen Körperchen aus, dagegen waren die Nucleolen der Kerne derart vergrößert, dass sie als GUARNIERI'sche Körperchen imponierten. Auch in der Nickhaut des *Gecko* konnte seinerzeit nach Vaccineimpfung eine Vergrößerung der Nucleolen nachgewiesen werden.

Bezüglich der Biologie des Vaccine-Erregers sei hier noch auf folgende Tatsachen hingewiesen: Durch etwa 20-stündige Einwirkung von Saponin, Galle, taurocholsaurem und ölsaurem Natrium wird das Virus abgetötet, durch Lecithin, Marke *Agfa*, durch $\frac{3}{4}$ Stunden zentrifugiert und etwa 4 Stunden sedimentiert, erhält man auf der Kaninchenkornea nur eine ganz lokale Reaktion. In den nach LÖFFLER gefärbten Leucocyten wurden kleine, ganz scharf umschriebene, runde oder ovale Lücken mit einem körnigen Einschluss, der den beschriebenen Körperchen ähnlich war, beobachtet.

Die sogenannten Ultrafiltrate, die durch eine Filtration durch Kolloidschichten gewonnen wurden, enthielten kein aktives Virus mehr; Kaninchen, die subkutan mit ihnen in Intervallen von 4 Tagen 3 mal mit je 2 ccm. behandelt wurden, zeigten keine Krankheitserscheinungen, erwiesen sich auch bei nachfolgenden Impfungen als nicht immun, ebenso

II. Circulação do vírus variolico no corpo

Repetidas vezes foram feitas inoculações sobre a pele raspada do abdome e na cornea de coelhos com abundante material de sangue, sôro, extratos de baço, rins e fígado de indivíduos que sucumbiram á variola confluyente ou hemorrajica. Para obter tais extratos reduziam-se os órgãos a pesquisar a fragmentos e depois cuidadosamente se os triturava em um gral. Em alguns cazos, obtivemos apenas reações positivas macroscópicas. Num caso de inoculação com sangue de variola *hemorrajica*, feita, não só nas 2 corneas de 4 coelhos, como na pele raspada do abdome obtivemos apenas numa cornea uma reação *retardada*, no fim de 6 dias e os córtex revelaram nella a presença dos *corpúsculos* de GUARNIERI. O vírus, ás vezes, atravessa a placenta, e, inoculações com resultados positivos foram obtidas em corneas de coelhos com o extrato de fígado de feto de uma mulher falecida de variola confluyente. Nas corneas assim inoculadas, puderam ser caracterizados, poucos *corpúsculos* de GUARNIERI, 3 dias apoz a inoculação. E' digna de nota a circumstância de que o feto não apresentava sinal algum exterior da molestia.

Dessas pesquisas resalta que ha *generalização de vírus variolico*, mas que, em geral, ella dura apenas um tempo determinado; e, mais tarde, apoz erupção das pustulas, apenas pela experimentação se póde verificar uma escassa circulação do vírus. Segundo CALMETTE e GUERIN, mesmo apoz inoculação intravenosa o vírus vacínico só circula no organismo pelo espaço de 24 horas; durante esse tempo se póde obter uma formação artificial de pustulas vacinaes, raspando ou arrancando os pêlos dos coelhos inoculados. Destas pesquisas decorrem ainda os fatos de que: 1.º o vírus possui uma tendencia a encantoar-se nas celulas, aí se multiplicando, e 2.º, de que sua presença *não é constante* nos líquidos do organismo. E' mais um *parazito da celula* que um *parazito dos líquidos organicos*. E' admiravel que com o suco obtido por expressão dos *órgãos internos*, apenas se tenham conseguido *poucos*

wie die Hühner, die mit Ultrafiltraten der Hühnerpest vorbehandelt worden sind.

II. Das Kreisen des Variolavirus im Körper

Wiederholt wurde Blut, Blutserum, ferner Extrakte von Milz, Niere und Leber von an konfluirender oder hämorrhagischer Variola gestorbenen Personen auf die rasierte Bauchhaut eines Kaninchens und auf mehrere Kaninchenkorneas in grosser Menge verimpft. Die Extrakte wurden in der Weise gewonnen, dass die fraglichen Organstücke zunächst fein zerschnitten und sodann in einer Reibschale sorgfältig zerrieben wurden. Nur in einigen Fällen erhielten wir *makroskopisch* positive Reaktionen. In einem Falle von Impfung mit Blut eines *hämorrhagischen* Falles an zwei Kaninchenkorneas sowie auf die rasierte Bauchhaut eines Kaninchens trat nur auf einer Kornea erst am 6. Tage sehr *verspätet* eine Reaktion auf und es konnten sodann in Schnittpräparaten die *GUARNIERI'schen Körperchen* nachgewiesen werden. Das Virus passiert unter Umständen auch die Placenta und es wurden mit Leberextrakt eines Fötus, dessen Mutter an *Variola confluens* gestorben, positive Impfungen vorgenommen und nach 3 Tagen in der geimpften Kaninchenkornea wenige *GUARNIERI'sche Körperchen* nachgewiesen. Bemerkenswert ist der Umstand, dass der Fötus keine äusseren Krankheitserscheinungen zur Schau trug.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass eine *Generalisation des Variolavirus* zwar stattfindet, dass diese aber allgemein nur eine bestimmte Zeit dauert und dass später nach dem Ausbruch der Pusteln nurmehr ein spärliches Kreisen des Virus experimentell nachweisbar ist. Nach CALMETTE und GUERIN kreist das Vaccinevirus selbst nach intravenöser Injektion nur 24 Stunden im Organismus; während dieser Zeit kann man auch durch Rasieren oder Kahlrufen der Haut des Kaninchens künstlich eine vaccinale Pustelbildung hervorrufen. Weiter ergibt sich aus diesen Versuchen, dass das Virus eine Tendenz besitzt, sich in den Zellen anzusiedeln und sich hier zu vermehren und dass es *nicht konstant* im

resultados positivos de inoculação, enquanto que com o material de pustulas, sem outro preparo, foram conseguidas, em todos os casos, inoculações positivas. Decorrem desses fatos, que carecem de ulterior verificação, que, apoz a generalização do virus da protopustulas hipoteitca de PFEIFFER, todas as células, segundo as pesquisas de MEYER e KEYSSELITZ respondem ao estímulo do antígeno por uma *iperplazia peculiar da substancia nucleolar*, mas que o virus se estabelece depois, de preferência, no *ectoderma* ou no *tecido subcutaneo colajeno* (NOBEL e HÜCKEL) e que d'aí também parte a imunidade. Em favor desta maneira de vêr fala também a pequena quantidade ou ausencia de anticorpos no sôro sanguineo e a *imunidade cutanea* admiravelmente duradoura.

III. Os fenomenos de imunidade na variola

Em nossas pesquisas procurámos verificar como se comportaria, inoculado na cornea de coelho o sôro de convalescentes de variola, colhido 12, 14, 15, 20, 24, 30 e 40 dias apoz cicatrização das pustulas, misturado com quantidades iguais de conteúdo de pustulas variolicas, colhido, tanto quanto possível, em pustulas frescas, e deixados em contato na geleira durante 20 a 24 horas, sendo repetidas vezes ajitado. Demonstraram as pesquisas de VOIGT que a *variola humana* inoculada na cornea de coelhos produz sintomas típicos não muito violentos e que se pôde verificar por meio de córtes a existencia de *corpúsculos* de GUARNIERI. Considerámos a ausencia desses corpúsculos, na cornea como um *índice da ação parasiticida de sôro utilizado*. Seja, porém, aqui recordado que também na *variola humana*, nas células da cornea dos coelhos não se encontram sempre os *corpúsculos* de GUARNIERI junto ao núcleo, mas que muitas vezes só se verifica um aumento dos nucleolos no interior do núcleo. Fatos analogos foram verificados na *cornea do homem* infetado pela variola. Uma cauza perturbadora no julgamento microscopico d'uma inoculação corneana é que, muitas vezes, com a linfa são inoculados estreptococos que produzem alte-

allgemeinen Säftekreislauf auftritt. Es ist *mehr ein Zellparasit als ein Säfteparasit*. Auffallend ist, dass mit den Presssäften aus den *inneren Organen nur wenige positive Impfresultate* erzielt worden sind, während wir mit dem *Pustelmaterial*, ohne es weiter aufzuschliessen, in *allen Fällen positive Impfungen* vornehmen konnten. Aus diesen noch weiter nachzuprüfenden Tatsachen folgt, dass nach der Generalisation des Virus von der hypothetischen Protopustel PFEIFFER's zwar alle Zellen nach den Untersuchungen von MAYER und KEYSSELITZ mit besonderen *Hyperplasien der Nucleolsubstanz* auf die Antigene antworten, dass aber das Virus sich *später vorwiegend im Ectoderm* oder in dem *kollagenen Gewebe der Subcutis* (NOBEL und HUECKEL) ansiedelt und von hier aus auch die Immunisierung stattfindet. Für diese Auffassung spricht auch der *geringe oder fehlende Antikörpergehalt im Blutserum* und die auffallend *lang andauernde kutane Immunität*.

III. Immunitäterscheinungen bei der Variola

Bei unseren Untersuchungen prüften wir zunächst das Serum von Patienten im Rekonvaleszenzstadium, also 12, 14, 15, 20, 24, 30, 40 Tage nach dem Abheilen der Pusteln, brachten dieses mit gleichen Mengen Variolapustelinhalt, der aus möglichst jungen Pusteln gewonnen wurde, auf etwa 20—24 Stunden im Eisschrank zusammen und verimpften es nach wiederholtem Durchschütteln auf die Kaninchenkornea. Nach den Untersuchungen von VOIGT ruft *Variola humana* auf der Kaninchenkornea typische, nicht zu stürmische Erscheinungen hervor und in den Schnitten kann man GUARNIERI'sche Körperchen nachweisen. Das Fehlen dieser Körperchen in den Schnitten sahen wir als ein *Zeichen für die parasiticide Wirkung des verwendeten Serums an*. Allerdings muss gleich hier betont werden, dass bei der *Variola humana* in den Zellen der Kaninchenkornea nicht überall neben den Kernen GUARNIERI'sche Körperchen liegen, sondern man findet oft bloß im Kern vergrößerte Nucleolen. Analoge Verhältnisse konnten auch in den *menschlichen Korneas* bei den

rações progressivas do epitelio corneano. Macroscopicamente, a cornea reaje, em todos os casos, da maneira usual, já por varias vezes descrita. Microscopicamente foram *sempre* verificados os *corpúsculos* de GUARNIERI, embora em quantidade variavel. O sôro de 12 a 14 dias, de acordo com essas pesquisas não mata *definitivamente* o virus variolico. Sob a influencia do sôro de 12 dias, o numero de *corpúsculos* de GUARNIERI *não era muito consideravel*. O sôro de 14 dias permitia a formação de maior cópia de corpúsculos e sob a ação do sôro de 49 dias apareciam, não só aumento de volume dos nucleolos, como, se verificava junto dos nucleos a presença dos *corpúsculos* de GUARNIERI. O sôro variolico apoz um certo tempo, quando muito, enfraquece o virus e mostra, em geral, uma *ausencia de anticorpos*. Do mesmo modo, o virus variolico, não se deixa influenciar pela ação d'um sôro vacinico proveniente d'um homem alerjetico inoculado repetidas vezes, no espaço de 3 anos, assim como tambem, a vacina não é influenciada pelo sôro de variolozo de 12 dias de molestia, colhido apóz desaparecimento dos sintomas morbidos, da maneira já referida.

Na *epidemia* que tivemos a oportunidade de observar achava-se o *virus variolico sempre associado a um estreptococo*, ajustando-se aqui entre elles, uma relação de simbioze ocasional analoga á das complicações da escarlatina, contribuindo para a gravidade de seu decurso. Inoculações feitas com esses 2 microorganismos, em series de pesquisas perfeitamente determinadas forneceram, em todos os casos observados, resultados muito particulares. Tratando-se corneas de coelhos com uma mistura de:

- 1.º Virus variolico (tanto quanto possivel material colhido em pustulas frescas)
- 2.º Sôro ativo (é indifferente que se tome sôro normal de homem, cavalo ou sôro vacinico ou variolico do 12.º ao 40.º dia) e
- 3.º Estreptococos (vivos ou mortos por um aquecimento de meia hõra a 60º)

verifica-se, em comparação com as testemunhas correspondentes, que já no fim de 24

Infektionen mit Variola nachgewiesen werden. Ein anderer Uebelstand bei der mikroskopischen Beurteilung der Korneaimpfungen ist der, dass vielfach mit der Lymphe Streptokokken mit verimpft werden und derart oft weitgehende Defekte des Korneaepithels veranlassen. Makroskopisch reagierte in allen Fällen die Kornea in der üblichen, mehrfach beschriebenen Weise. Mikroskopisch wurden *immer* GUARNIERI'sche Körperchen, allerdings in *schwankenden* Mengenverhältnissen nachgewiesen. Das Serum von 12 bis 14 Tagen tötete auf Grund dieser Versuche das Variolavirus *nicht endgültig* ab. Die Menge der GUARNIERI'schen Körperchen war unter Einfluss des 12-Tageserums *nicht sehr erheblich*. Das Serum von 14 Tagen lieferte eine reichlichere Ausbeute und unter Einwirkung des 40-Tageserums waren sowohl die Nucleolen vergrößert als auch traten neben den Kernen GUARNIERI'sche Körperchen auf. Das Variolaserum schwächt demnach nach einem gewissen Zeitpunkt höchstens das Virus ab und zeichnet sich im allgemeinen durch einen *Mangel an Antikörpern* aus. Das Variolavirus wird in gleicher Weise nicht durch das Vaccineserum eines durch 3 Jahre wiederholt geimpften, allergetischen Menschen beeinflusst, ebenso wenig beeinträchtigt das Variolaserum vom 12. Tage nach dem Aufhören der Erscheinungen die Vaccine in nennenswerter Weise.

Bei der Epidemie, die wir zu beobachten Gelegenheit hatten, war das *Variolavirus stets mit einem Streptokokkus vergesellschaftet* und bedingte so in diesem *gelegentlichen Symbioseverhältnisse ähnlich wie beim Scharlach* Komplikationen in der Schwere des Krankheitsverlaufes. Impfungen, die mit diesen *beiden* Mikroorganismen unter ganz bestimmten Versuchsanordnungen vorgenommen worden sind, lieferten in allen beobachteten Fällen ein ganz eigenartiges Resultat. Behandelt man nämlich eine Kaninchenkornea mit einer Mischung:

1. von Variolavirus (möglichst frisches Pustelmaterial),
2. aktivem Serum (es ist gleichgültig, ob man normales Menscheneserum, Pferdeserum, Vaccineserum oder Variolaserum von 12 bis 14 Tagen nimmt) und

hóras ha *reações extremamente intensas* associadas com perdas progressivas do epitelió, leucocitose e profundas erosões. As perdas epiteliais eram muitas vezes muito consideráveis e, por uma espécie de citolisteze, as células pigmentadas do limbo corneano caminhavam centripetamente. Encontravam-se os estreptococos entre as células epiteliais; mais tarde, também, sob a forma de acumulos entre as fibras do tecido conjuntivo sotoposto à membrana basal. Como testemunhas foram feitas inoculações com as seguintes misturas, preparadas 24 horas antes:

- 1.º Estreptococos vivos + sôros de diversas proveniências.
- 2.º Virus variolico + sôros inativos de proveniências diversas.
- 3.º Sôro só.
- 4.º Estreptococos só.
- 5.º Virus variolico normal, só.
- 6.º Virus variolico inativado, a 45º.
- 7.º Estreptococos + virus variolico.

Pensámos em tornar as experiências mais exatas, empregando nas misturas acima e deixando em contato durante 24 horas o virus variolico, préviamente passado através velas de BERKEFELD. Infelizmente, estes ensaios não deram resultados claros, porque, pelo fato da filtração, se reduzia muito a quantidade de virus. Todavia, dessas pesquisas resalta que, para que se estabeleça uma intensa reação devem coexistir 3 elementos: *virus variolico*, *toxina estreptococica* e a *parte termolabil* de um sôro qualquer. Estes fatos seguramente *nada* têm que vêr com a imunidade porque, em todos os casos, nas poucas células epiteliais ainda conservadas se viam *corpúsculos* de GUARNIERI, assim como também a espécie de sôro usada não tinha influencia sobre o resultado. A *associação ocasional do virus variolico e estreptococo* pertence, segundo FRANK (Contribuição para a biologia das plantas 1877) ao grupo dos fenomenos biológicos, descritos sob o nome de *Simbioze*, e aqui se trate de *pseudo-parazitismo*, porque os 2 organismos são, no que toca a alimento, independentes um do outro. Elles podem também subsistir independentemente,

3. Streptokokken (lebend oder bei 60° C. auf eine halbe Stunde abgetötet), so erhält man im Verhältnis zu den entsprechenden Kontrollen bereits nach 24 Stunden *äußerst stürmische Reaktionen*, verbunden mit weitgehendem Epithelverlust, Leucocytose und tiefen Erosionen. Die Epithelverluste waren oft sehr bedeutend und durch eine Art von Cytolisthesis rückten die pigmentierten Zellen des Kornearandes zentripetal vor. Die Streptokokken fand man zwischen den Epithelzellen, später aber auch nesterweise zwischen den unter der Basalmembran verlaufenden Bindegewebszügen. Zur Kontrolle wurden Impfungen mit folgenden 24 Stunden alten Mischungen vorgenommen:

1. lebende Streptokokken + verschiedenartiges Serum,
2. Variolavirus + verschiedene inaktive Sera,
3. Serum allein,
4. Streptokokken allein,
5. normales Variolavirus allein,
6. bei 45° inaktiviertes Variolavirus,
7. Streptokokken + Variola.

Die Versuche hofften wir noch in der Weise exakter zu gestalten, dass wir das Variolavirus vorher durch *Berkefeld-Filter* filtrierten und dann 24 Stunden die oben erwähnten Mischungen ansetzten. Leider fielen gerade diese Versuche nicht deutlich aus, da das Virus durch die Filtration viel *an Menge* eingebüsst hatte. Immerhin geht aus den Versuchen hervor, dass an dem Zustandekommen der stürmischen Reaktionen *3 Elemente beteiligt sind: Variolavirus, Streptokokktoxine* und ein *thermolabiler Bestandteil* irgend eines Serums. Mit der Immunität haben die Phänomene sicherlich *nichts* zu tun, weil in allen Fällen in den wenigen noch erhaltenen Epithelzellen GUARNIERI'sche *Körperchen* nachgewiesen worden sind und auch die Art des Serums nicht ausschlaggebend war. Die *gelegentliche Vergesellschaftung von Variolavirus und Streptokokken* gehört nach FRANK (Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1877) in die Gruppe der biologischen Erscheinungen, die wir als *Symbiose* bezeichnen, und zwar handelt es sich hier um *Pseudoparasitismus*, da beide Organismen in ihrer Ernährung von *einander*

mas, se ocasionalmente vierem juntos, obram perturbando duplamente o organismo atacado. WARD (Philos. Trans. 1892) descreveu essa «associação dijuntiva» de dois organismos, que ocasionalmente exercem, um sobre o outro e de maneira tranzitoria relações de trocas, sob o nome de *Meta* ou *Antibiose* (*antagonismo* DE BARY). PFEFFER encararia o caso de simbiose aqui descrito como uma simbiose dijuntiva. Relativamente á infecção do organismo devemos agrupar os fenomenos de simbiose em 3 seções:

- 1.º Simbiontes que absolutamente se não influenciam mutuamente nos seus modos de viver (simbiontes indiferentes).
- 2.º Simbiontes que ganham certa elevação de virulencia e assim prejudicam em maior escala o organismo atacado (simbiontes sinerjeticos).
- 3.º Simbiontes, dos quais um prepara o alimento para o outro.

Assim o *Aspergillus orizæ* ou o *Mucor orizæ* prepara o alimento para o fermento, sacrificando-lhe o amido (simbiontes antibioticos).

Ao segundo grupo pertence a simbiose aqui descrita entre o estreptococo e o virus variolico. Igual fato se verifica entre o estreptococo e o agente produtor da escarlatina. Do mesmo modo obram sinerjicamente, segundo LECLAINCHE e VALLÉE (Ann. Institut Pasteur 1900) uma estreptotricea cromojena ou um estreptococo não patojeno, com o bacilo do carbunculo sintomatico. Ao contrario, é inativa a associação do *Bac. rhusiopathie sui* ou o *Bacterium coli* com o mesmo virus do carbunculo sintomatico.

A explicação mais simples e natural para a ação simbiotica de conjunto dos 2 microorganismos parece ser que, em 1.º lugar as celulas epiteliaes são lezadas pelo virus variolico e reagem pela hipertrofia dum dos componentes celulares, que se relacionam microscopicamente com a substancia nuclear (*corpúsculos* de GUARNIERI); em virtude desta desproporção o processo vital sofre um enfraquecimento e não póde opôr rezistencia alguma á toxina do estreptococo.

durchaus unabhängig sind. Sie können auch selbständig auftreten, gelegentlich aber zusammengebracht, wirken sie auf den befallenen Organismus doppelt zerstörend. WARD (Philos. Trans., 1892) bezeichnete diese «disjunktive Association» zweier Organismen, die in gelegentlichen, vorübergehenden Wechselbeziehungen zu einander stehen, als *Meta- oder Antibiose* (*Antagonismus* DE BARY'S). PFEFFER würde den hier beschriebenen Symbiosefall unter dem Begriff der disjunkten Symbiose zusammenfassen. In Bezug auf die Infektion des Organismus müssen wir die Erscheinungen der Symbiose in 3 Gruppen einteilen:

1. Symbionten, die durch ihre Lebensweise einander garnicht beeinflussen (indifferente Symbionten),
2. Symbionten, die eine Art von Virulenzsteigerung erfahren und den befallenen Organismus in erhöhtem Masse schädigen (synergetische Symbionten),
3. Symbionten, von denen der eine dem anderen den Nährboden vorbereitet.

So bereitet der *Aspergillus oryzae* oder *Mucor oryzae* der Hefe den Nährboden vor, indem er vorher die Stärke verzuckert. (Antibiotische Symbionten).

In die zweite Gruppe gehört die hier beschriebene Symbiose zwischen Streptokokken und Variolavirus. Aehnliche Verhältnisse sind auch von dem Scharlacherreger und den Streptokokken bekannt. In gleicher Weise wirkt synergetisch nach LECLAINCHE und VALLÉE (Ann. Inst. Pasteur, 1900) eine chromogene Streptothrix oder ein nicht pathogener Streptokokkus in Verbindung mit dem Rauschbrandvirus. Unwirksam ist dagegen die Assoziation des Rauschbrand mit dem *Bacillus rhusiopathie sui* oder *Bacterium coli*.

Die einfachste und natürlichste Erklärung für das symbiotische Zusammenwirken beider Mikroorganismen scheint die zu sein, dass zunächst die Epithelzellen durch das Variolavirus geschädigt werden und durch eine Hypertrophie einer Zellkomponente, die mikroskopisch an die Nuklearsubstanzen (GUARNIERI'sche Körperchen) gebunden ist, reagieren; durch diese Missverhältnisse erleiden sie im

As toxinas parecem prejudicar diretamente o protoplasma das células, pelo que morre este com rapidez. Secundariamente os cócos se multiplicam com vivacidade e afetam de modos varios as demais circunscrições orgânicas. As células anormais do corpo, em relação com as normais sofrem mais prejuizo com o ataque dos estreptococos, com o que está de acôrdo a observação de JANICKE e NEISSER («Zentralbl. f. Chirurgie» 1884), que, em consequencia duma inoculação de erizipela em doente de carcinoma verificaram que os estreptococos produziram um processo regressivo das células carcinomatosas. De que neste caso se trata, na realidade, da toxina estreptococica é verificavel, porquanto mesmo resultado se obtem, empregando culturas de estreptococos mortos pelo calor. Segundo LINGELSHEIM os venenos do estreptococo são bastante rezistentes ao calor. Papel analogo ao representado na variola exercem os estreptococos em varias afeções vacinicas, no impetigo (BALZER, GRIFFON, MESLAY e KURTH) no exantema escarlatinozo e reumatismo articular. Tambem se atribue o exantema da escarlatina traumatica a ação toxica do estreptococo. Tambem, de acôrdo com a definição de simbioze acima dada, pôde haver variola sem estreptococos, assim como RUMPEL observou cazos de escarlatina, nos quais o estreptococo não era caraterizavel.

Lebensgetriebe eine Schwächung und können den Toxinen der Streptokokken keinen Widerstand mehr leisten. Die Toxine scheinen direkt das Protoplasma der Zelle zu schädigen, worauf diese rapide zugrunde geht. Sekundär vermehren sich die Kokken sehr lebhaft und affizieren in mannigfaltiger Weise die übrigen Organbezirke. Dass abnorme Körperzellen im Verhältnis zu normalen Zellen von Streptokokktoxinen mehr angegriffen werden, dafür spricht die Beobachtung von JANICKE und NEISSER (Zentralbl. für Chirurgie, 1884), der zufolge bei einem Impferysipel eines Karzinomkranken die Streptokokken die Krebszellen zu regressiven Prozessen veranlassen. Dass es sich hier um Toxine der Streptokokken handelte, dafür spricht auch der Umstand, dass wir mit durch Wärme abgetöteten Streptokokken dieselben Erscheinungen hervorrufen konnten. Nach LINGELSHEIM sind die Streptokokkengifte gegen Wärme ziemlich resistent.

Eine ähnliche Rolle wie bei der Variola spielen die Streptokokken bei manchen Vaccineaffektionen, bei Impetigo (BALZER und GRIFFON, MESLAY, KURTH), bei Scharlaxexanthemen und Gelenkrheumatismus. Ferner führt man die Exantheme bei Wundscharlach gleichfalls auf eine Giftwirkung der Streptokokken zurück. Ebenso wie es der oben gelieferten Definition der Symbiose zufolge eine Variola ohne Streptokokken gibt, sind von RUMPEL Scharlachfälle beobachtet worden, bei denen Streptokokken nicht nachweisbar waren.

